

総 説 (教授就任記念講演)

臨床医の内分泌代謝疾患研究：骨カルシウム代謝異常症を中心に

遠 藤 逸 朗

徳島大学大学院医歯薬学研究部生体機能解析学分野

徳島大学病院内分泌代謝内科

(平成31年3月18日受付) (平成31年3月19日受理)

はじめに

日本の医療は世界に類をみない早さで進行する高齢化社会により、急速に様変わりしつつある。特に、加齢に伴い有病率が増加する生活習慣病や筋骨格系疾患に対するマネジメントの重要性が増している現状がある。私は臨床医として糖尿病や骨粗鬆症、サルコペニアなど、高齢者のQOLおよび生命予後の悪化に関与する疾患の治療に当たるとともに、これらの疾患を克服に寄与できると考えられる基礎および臨床研究を行ってきた。本総説では、私がこれまでに行ってきた研究の概要と現在の最新知見との関連を含め概説する。

1. ビタミンDの筋肉作用

ビタミンDは、ビタミンD受容体(VDR)と結合して種々の遺伝子発現変化(genomic action)を介してその作用を発揮するとともに、遺伝子発現変化を伴わずに細胞内のセカンドメッセンジャーの活性化などを介した反応(non-genomic action)も存在することが報告されている。骨格筋細胞にはVDRが発現しており、骨格筋もビタミンDの標的臓器であると考えられている^{1,2)}。われわれは、VDRノックアウトマウス骨格筋を解析し、Myf5, myogenin, E2Aといった幼弱な分化段階において発現する骨格筋分化制御遺伝子の発現亢進を伴う筋発育異常を示すことを明らかにした²⁾。われわれのこの論文発表の後に、活性型ビタミンDが筋芽細胞の増殖や分化を調節することを示すデータが数多く報告された。たとえば、活性型ビタミンDはc-Srcの活性化、MAPKファミリーに属するERK1/2の活性化を介し、c-mycやc-fosの発現上昇をきたすこと¹⁾、VDRを介したp38MAPKおよ

びその下流のAktのリン酸化³⁾および骨格筋量を負に制御するmyostatinの発現を抑制する⁴⁾ことなどが示されている。われわれの検討結果を含めてこれまでの知見を総合すると、活性型ビタミンDはgenomicおよびnon-genomic双方の作用を介して骨格筋の分化、増殖、発育を正に制御する作用を有すると考えられる。

一方ヒトにおいても、ビタミンDは骨格筋量や骨格筋機能との関連を示す検討結果が報告されている。65歳以上の高齢者では1年間で30%、80歳以上では40-50%に転倒がみられ、高齢者の骨折の大部分は転倒に関連して起こることが知られている。60歳以上を対象とした転倒防止効果のメタ解析⁵⁾では、ビタミンD投与は転倒の危険性を22%減少させている。また、ビタミンD充足の指標である血清25(OH)D濃度の低下は骨格筋量や身体能力および活動性の低下と有意な関連性を示すことが報告されている⁶⁾。さらにビタミンD非充足では速筋であるtype II線維の萎縮が認められ、ビタミンD補充により同線維の数とサイズが上昇することが示されている。実際、ビタミンDは骨密度改善量以上の骨折防止効果を示すことが以前から指摘されているが、このような骨格筋作用を介した転倒防止効果が骨折防止につながる可能性があると考えられる。

わが国では高齢化社会が進行し、骨格筋量が減少するサルコペニアが国民健康上の問題となりつつある。また、わが国における検討では、勤労世代においても9割程度とかなりの高頻度のビタミンD欠乏症/不足症が存在することも示されている⁷⁾。今後はビタミンD充足の改善による介入で加齢によるサルコペニアが防げるか、サルコペニアの改善に伴う骨折リスクの減少はあるのかと言ったデータの蓄積にも期待したい。

2. ヒト CaSR 活性型変異導入マウス (ADH1モデルマウス) の解析

カルシウム感知受容体 (CaSR) は, 1993 年に Brown ら⁸⁾によりウシ副甲状腺からクローニングされた。CaSR は G 蛋白共役型の受容体であり, 細胞外カルシウム濃度を感知して副甲状腺からの PTH 分泌調節および腎尿細管からの Ca 再吸収を介した細胞外 Ca 濃度の維持に中心的な役割を果たしていることが知られている。常染色体優性低 Ca 血症 (ADH) 1 型は CaSR の活性型変異により発症し, PTH 分泌低下を伴う低 Ca 血症をきたす⁹⁾。本症においては, 活性型ビタミン D 製剤を投与した場合, 尿中 Ca 排泄増加に起因する尿路結石形成が問題となる。Calcilytics は CaSR の阻害薬であり, 尿中 Ca 排泄促進作用があるビタミン D 投与と比較すると ADH1 の病態をよりよく改善できると考えられる。実際, 30 以上の CaSR 活性型変異に対する calcilytics の有効性が *in vitro* の系で示されている¹⁰⁻¹²⁾。われわれは, ヒト CaSR 活性型変異, C129S, A843E をマウス CaSR の ATG 下流に導入した遺伝子改変マウスを作成した。このマウスは PTH 分泌低下を伴う低 Ca 血症, 高 P 血症, 高 Ca 尿症, 腎石灰化などいずれも ADH1 型の表現型を再現できていた¹³⁾。Calcilytics の一つである JTT-305/MK-

5442 は, 同マウスにおいて用量依存的な PTH 分泌促進作用を示すとともに, これらの ADH1 の表現型をすべて改善した。Hannan ら¹⁴⁾も ADH1 モデルマウスに calcilytics である NPS2143 を投与して ADH1 の表現型が改善したことを報告している。これらの, *in vivo*, *in vitro* の結果より, calcilytics は ADH1 型の特効薬たり得る可能性がある。実際, calcilytics NPS795 (SB-423562) は ADH1 型への臨床応用について検討中とのことである。

さらにわれわれは, A843E マウスがインスリン分泌低下を伴う血糖上昇をきたすこと, この血糖上昇は JTT-305/MK-5442 投与により改善することを示している¹⁵⁾。また, 同マウスでは低骨代謝回転に伴う微小損傷が皮質骨に蓄積しており, この結果骨強度パラメーターが低下していること, JTT-305/MK-5442 および PTH の投与により骨代謝回転を改善させると微小損傷の減少とともに骨強度の低下が回復することも報告している¹⁶⁾。ヒトにおいても副甲状腺機能低下症は低骨代謝回転であり, 骨密度がむしろ増加しているにもかかわらず脆弱性骨折が多いという報告もあり, われわれが報告した ADH1 モデルマウスに関する骨強度データはこの臨床データの裏付けとなると考えている。

図 1 に ADH1 モデルマウスの表現型を示した。CaSR は骨, 腎, 膵に所見がみられ, 生体の恒常性維持に重要

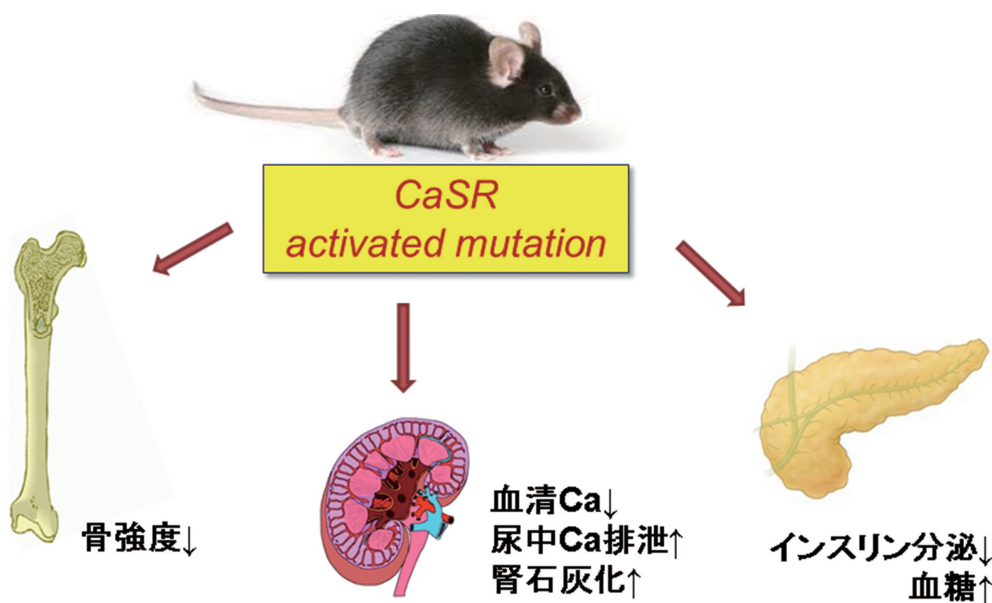


図 1 ADH1モデルマウスの表現型

ADH1モデルマウスでは低骨代謝回転を伴う骨強度低下, 血清 Ca 濃度の上昇および尿中 Ca 排泄増加を伴う腎石灰化, インスリン分泌低下を伴う血糖上昇が認められる。

な役割を果たしていることが示された。さらに Preliminary な結果ではあるが野生型マウスに calcilytic を投与したところ血糖の低下が認められている。この結果から、CaSR は糖尿病の治療ターゲットたり得る可能性もあるのではないかと期待している。

3. Interleukin-11による幹細胞分化調節

われわれは力学的負荷や PTH により骨芽細胞系細胞での発現が強力に促進される一方、加齢やグルコルチコイドにより発現が著明に抑制される因子として interleukin (IL)-11を見いだした(図2)。力学的負荷や PTH は PKC δ を介して BMP シグナルの下流因子の Smad1 をリン酸化することや BMP2 は骨芽細胞に対して IL-11 発現促進作用を有すること¹⁷⁾ などをおもに *in vitro* の系で報告してきた。一方、IL-11 の過剰発現により骨形成が促進されること¹⁸⁾ も示されている。われわれはさらに IL-11 ノックアウトマウスを作製し、解析をおこなっている。本マウスにおいては骨芽細胞マーカーの低下を伴う荷重骨骨量の低下と脂肪組織の増加、荷重免荷から再荷重負荷に転じた際のスクレロステチンおよび DKK1, 2 の高発現

を伴う骨密度改善抑制などの所見がみられており、これまでの *in vitro* 結果をサポートする所見が得られていると考えている。さらに、同マウスでは脂肪組織での PPAR γ , TNF α , MCP1 の発現増加を伴う内臓脂肪組織の増加がみられること、これに伴い血糖の上昇や脂質異常症など、メタボリック症候群様の表現型を示すことを明らかにした¹⁸⁾。これまでの検討結果を総合すると、IL-11 は骨粗鬆症およびメタボリック症候群両方の治療ターゲットたり得る可能性があると考えている。

4. FGF23関連低リン血症性疾患

2000年に常染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症 (autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: ADHR) の原因因子として FGF23 が同定され、ほぼ同時に腫瘍性骨軟化症 (tumor-induced osteomalacia: TIO) の惹起因子であることが明らかにされた。その後の FGF23 産生組織の検討や FGF23 異常症により惹起される疾患の同定により、FGF23 は骨で産生され、リンやビタミン D 代謝を調節するホルモンであることが示された。FGF23 過剰に起因する病態では、いずれも腎

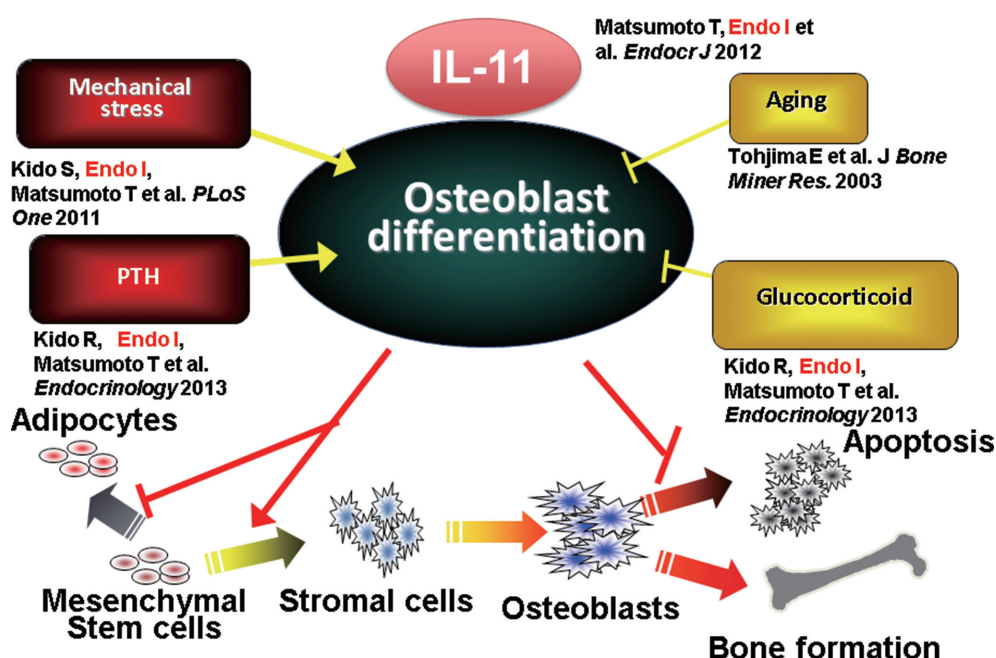


図2 IL-11による幹細胞分化の調節

骨芽細胞と脂肪細胞はともに間葉系幹細胞を起源とし、その分化過程は種々の転写因子により厳密に制御されている。力学的負荷応答や PTH に反応する AP1 依存的な IL-11 の発現が骨芽細胞分化を促進し、骨芽細胞のアポトーシスを抑制するとともに脂肪細胞分化を抑制する。一方、グルコルチコイドや加齢はこの系の抑制を介して骨芽細胞分化を抑制する。

近位尿細管リン再吸収の低下を伴う低リン血症と、低リン血症には不相応な低-正1,25水酸化ビタミンD血症を特徴としている。しかしながら、これらの疾患の発症頻度は決して高くないため、FGF23過剰に基づくリン代謝異常症の位置づけは必ずしも明確ではなかった。そこで、その病態把握を目的として厚生労働省ホルモン受容機構異常に関する調査研究班において低リン血症性くる病・骨軟化症について、2006年に全国アンケート調査が行われた。TIO 32例、X染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症（X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia: XLH）28例、ビタミンD欠乏症やFanconi症候群を含むその他の原因による低リン血症17例の患者データを集積し、検討した。図3にはTIO、XLHのリン関連パラメーターを対象全体、未治療群、活性型ビタミンD製剤やリン製剤などによる治療群に分けて示している。TIOでは著明なTmP/GFRの低下（ 1.24 ± 0.08 mg/dl）を伴う低リン血症（ 1.67 ± 0.08 mg/dl）、正常下限の血清1,25水酸化ビタミンD濃度（ 21.0 ± 3.3 pg/ml）、著明な血清FGF23濃度高値（ 1149.1 ± 541.3 pg/ml）を認め、これらは治療の有無で有意な差を認めなかった。XLHでもTIOよりは程度は軽いものの、同様にTmP/GFRの低下（ 2.14 ± 0.17 mg/dl）を伴う低リン血症（ 2.36 ± 0.10 mg/dl）と血中FGF23の上昇（ 155.4 ± 30.9 pg/ml）を伴う疾患であることが示された。ま

た、興味深いことに、活性型ビタミンDやリン製剤による治療群では、未治療群と比してTmP/GFRが有意に低く（ 1.84 ± 0.13 mg/dl vs 2.56 ± 0.34 mg/dl）、血中FGF23濃度が有意に高い（ 208.7 ± 46.4 pg/ml vs 84.5 ± 27.4 pg/ml）という結果が得られた。つぎに、TIO、XLH、その他の原因による低リン血症疾患における血清リン値とFGF23濃度をプロットしたところ、TIOおよびXLHでは、治療の有無にかかわらず、低リン血症を有し、かつFGF23血中濃度が30 pg/ml以上であった（図4）。一方、その他の原因による低リン血症では、血中FGF23濃度が30 pg/ml以下であり、大部分の症例で測定感度以下を示した。したがって、低リン血症の存在下では、活性型ビタミンDやリン製剤による治療の有無にかかわらず、血中FGF23濃度30 pg/mlをカットオフ値としてFGF23過剰が原因であるTIOおよびXLHとFGF23過剰に起因しないビタミンD欠乏やFanconi症候群などによる低リン血症性疾患を鑑別できることが明らかとなった¹⁹⁾。さらに、同ホルモン班では、2010年に特定疾患疫学に関する研究班との共同研究でFGF23関連低リン血症性疾患の全国疫学調査をおこなった。一次調査では、2895施設の内科（内分泌代謝内科）、整形外科、小児科（抽出率 20.5%）を対象に2005年から2009年の5年間の患者調査を実施した。その結果、2895施設中1149施設より回答があり（回答率39.7%）、患者有り

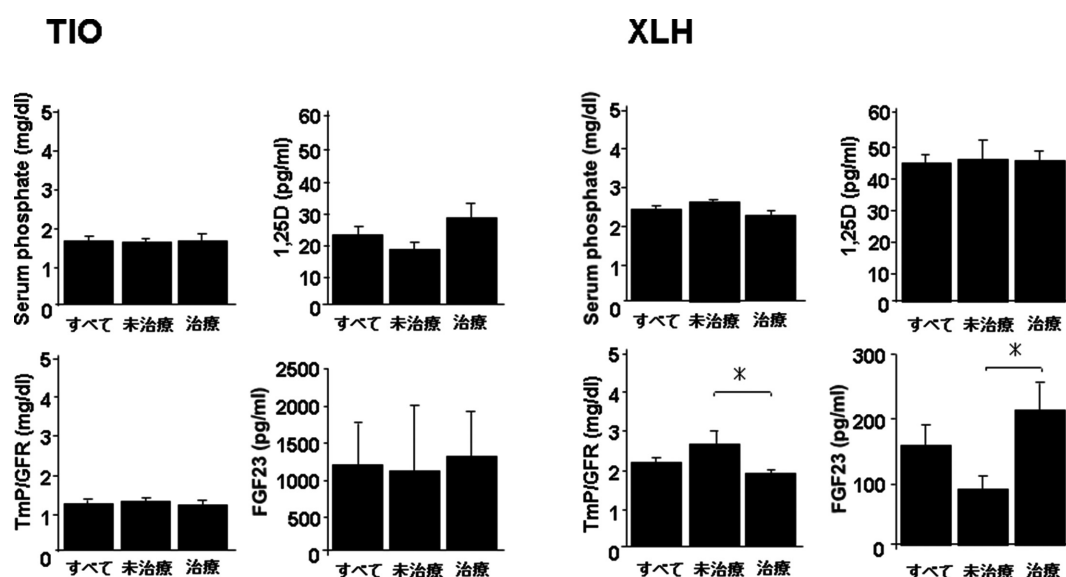


図3 TIO および XLH におけるリン関連パラメーター 文献19を改変
活性型ビタミンDやリン製剤の治療の有無にかかわらず TmP/GFR の低下を伴う低リン血症と血中 FGF23 濃度の上昇がみられた。

の施設は95, 患者数は331例/5年間であった。これより、本症の年間発症例数は、男性55例(95% CI 30-81), 女性62例(95% CI 40-84), 合計117例(95% CI 75-160)と算出された²⁰⁾。なお、この結果より算出したXLHの推定発症率は1/20,000となり、これは北米における発症率²¹⁾とほぼ同等であった。さらに、一次調査で症例有りと回答いただいた施設には、遺伝子検索の有無やTIO

であれば外科的治療の有無、治療内容や治療前後のリン関連パラメーターを記載するアンケートを送付し、二次調査とした。その結果、表1に示すごとく本邦でも多彩な原因によるFGF23関連低リン血症性疾患が存在することが明らかとなった。TIOでは35例が責任腫瘍の摘出による診断確定がなされていた。遺伝性低リン血症性くる病では36例のXLH, 3例のARHR1, そしてARHR2およ

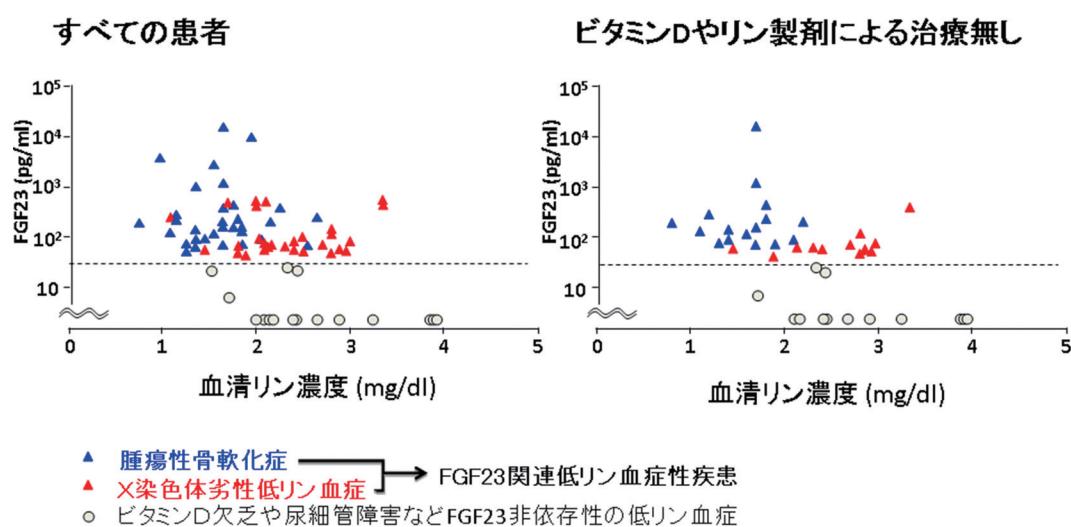


図4 低リン血症を有する患者のFGF23濃度：FGF23関連低リン血症とその他の疾患の比較
FGF23関連低リン血症であるTIO, XLHはいずれの症例も血清FGF23濃度が30 pg/ml以上であり、ビタミンD欠乏症や尿細管障害などでは血清FGF23濃度は30 pg/ml未満であった。

表1 FGF23関連低リン血症性疾患全国二次調査における患者数と発症年齢

疾患	症例数	発症年齢	
腫瘍性骨軟化症	男性	19	27-64
	女性	16	16-79
	合計	35	16-79
遺伝性低リン血症性くる病 XLH, ARHR, ADHR	男性	15	0-7
	女性	26	0-7
	合計	41	0-7
含糖酸化Fe製剤による低リン血症	男性	3	59-87
	女性	3	43-54
	合計	6	43-87
その他	男性	0	
	女性	3	1-83
	合計	3	1-83
		85	59

FGF23関連低リン血症性疾患における血清 FGF23濃度カットオフ値 (30pg/ml) 妥当性確認

年間発症症例数は、
男性55例(95% CI 30-81)
女性62例(95% CI 40-84)
合計117例(95% CI 75-160)
と算出された。

病理診断確定
35

遺伝子診断確定
15

中止後リン
上昇確認
6

診断確定
3

びADHRが1例ずつ含まれ、その診断年齢はいずれも7歳以下であった。なお遺伝性低リン血症くる病では、遺伝子診断まで施行できていた症例はこれらのうち15例にとどまった。線状皮脂腺母斑症候群を含むその他の疾患は3例の報告があった。

TIOでは責任腫瘍の発見が難しく、全摘が困難であれば病態の完全回復は難しい²⁰⁾。また遺伝性低リン血症くる病においては、現状の治療であるビタミンDやリン製剤の投与ではやはり病態の完全回復は困難であることが多い。現在(2019年3月)、XLHに対する抗FGF23抗体の臨床試験が進行しており²¹⁾、その結果が期待される。

おわりに

私がこれまでに行ってきた基礎および臨床研究、とくに骨カルシウム代謝疾患関連のものを概説した。引き続き内分泌代謝内科医としての視点から、患者さんのメリットになる研究を行っていきたいと考えています。ご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。

文 献

- 1) Girgis, C. M., Clifton-Bligh, R. J., Hamrick, M. W., Holick, M. F., *et al.*: The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. *Endocr Rev.*, **34**(1): 33-83, 2013
- 2) Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., *et al.*: Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology.*, **144**(12): 5138-44, 2003
- 3) Buitrago, C., Pardo, V. G., Boland, R.: Role of VDR in 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **136**: 125-30, 2013
- 4) Garcia, L. A., King, K. K., Ferrini, M. G., Norris, K. C., *et al.*: $1, 25(\text{OH})_2$ vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology.*, **152**(8): 2976-86, 2011
- 5) Bischoff-Ferrari, H. A., Dawson-Hughes, B., Willett, W. C., Staehelin, H. B., *et al.*: Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA.*, **291**(16): 1999-2006, 2004
- 6) Scott, D., Ebeling, P. R., Sanders, K. M., Aiken, D., *et al.*: Vitamin d and physical activity status: associations with five-year changes in body composition and muscle function in community-dwelling older adults. *J Clin Endocrinol Metab.*, **100**(2): 670-8, 2015
- 7) Akter, S., Eguchi, M., Kurotani, K., Kochi, T., *et al.*: Serum 25-hydroxyvitamin D and metabolic syndrome in a Japanese working population: The Furukawa Nutrition and Health Study. *Nutrition.*, **36**: 26-32, 2017
- 8) Brown, E., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., *et al.*: Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.*, **366**: 575-80, 1993
- 9) Roszko, K. L., Bi, R. D., Mannstadt, M.: Autosomal Dominant Hypocalcemia (Hypoparathyroidism) Types 1 and 2. *Front Physiol.*, **7**: 458, 2016
- 10) Letz, S., Rus, R., Haag, C., Dörr, H. G., *et al.*: Novel activating mutations of the calcium-sensing receptor: the calcilytic NPS-2143 mitigates excessive signal transduction of mutant receptors. *J Clin Endocrinol Metab.*, **95**(10): E229-33, 2010
- 11) Leach, K., Wen, A., Cook, A. E., Sexton, P. M., *et al.*: Impact of clinically relevant mutations on the pharmacoregulation and signaling bias of the calcium-sensing receptor by positive and negative allosteric modulators. *Endocrinology.*, **154**(3): 1105-16, 2013
- 12) Nakamura, A., Hotsubo, T., Kobayashi, K., Mochizuki, H., *et al.*: Loss-of-function and gain-of-function mutations of calcium-sensing receptor: functional analysis and the effect of allosteric modulators NPS R-568 and NPS 2143. *J Clin Endocrinol Metab.*, **98**(10): E1692-701, 2013
- 13) Dong, B., Endo, I., Ohnishi, Y., Kondo, T., *et al.*: Calcilytic Ameliorates Abnormalities of Mutant Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Knock-In Mice Mimicking Autosomal Dominant Hypocalcemia (ADH). *J Bone Miner Res.*, **30**(11): 1980-93, 2015
- 14) Smith, K. A., Ayon, R. J., Tang, H., Makino, A., *et al.*: Calcium-Sensing Receptor Regulates Cytosolic [Ca²⁺] and Plays a Major Role in the Development of

- Pulmonary Hypertension. *Front Physiol*, **7** : 517, 2016
- 15) Kurahashi, K., Endo, I., Namakura, M., Ohnishi, Y., *et al.* : ASBMR 2016 Annual meeting Abstract
- 16) Dong, B., Endo, I., Ohnishi, Y., Ooguro, Y., *et al.* : Persistent activation of calcium-sensing receptor suppresses bone turnover, increases microcracks and decreases bone strength. *JBMR Plus* in press, 2019
- 17) Kido, S., Kuriwaka-Kido, R., Umino-Miyatani, Y., Endo, I., *et al.* : Mechanical stress activates Smad pathway through PKC δ to enhance interleukin-11 gene transcription in osteoblasts. *PLoS One*, **5**(9) . pii : e13090, 2010
- 18) Takeuchi, Y., Watanabe, S., Ishii, G., Takada, S., *et al.* : Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice. *J Biol Chem*, **277**(50) :49011-8, 2002
- 19) Endo, I., Fukumoto, S., Ozono, K., Namba, N., *et al.* : Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients : proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone*, **42**(6) : 1235-9, 2008
- 20) Endo, I., Fukumoto, S., Ozono, K., Namba, N., *et al.* : Nationwide survey of fibroblast growth factor 23 (FGF23)-related hypophosphatemic diseases in Japan : prevalence, biochemical data and treatment. *Endocr J*, **62**(9) : 811-6, 2015
- 21) Carpenter, T. O. : New perspectives on the biology and treatment of X-linked hypophosphatemic rickets. *Pediatr Clin North Am*., **44** : 443-466, 1997

Basic and clinical research for Endocrine and Metabolic disorders by a clinician

Itsuro Endo

Department of Chronomedicine, Tokushima University Graduate School of Medical Sciences, Tokushima, Japan

Department of Endocrinology and Metabolism, Tokushima University Hospital, Tokushima, Japan

SUMMARY

In our country, the management of lifestyle-related diseases and musculoskeletal disorders is becoming more important with the rapidly advancing aging society. I have conducted both basic and clinical research that could contribute to the amelioration of these diseases from the point of view of a clinician. Specifically, I have identified that skeletal muscle differentiation and developmental abnormalities in vitamin D receptor knockout mice, activated calcium-sensing receptor knock-in mice showed various metabolic abnormalities, regulation of stem cell differentiation by IL-11 and so on. We also conducted nationwide survey of fibroblast growth factor 23-related hypophosphatemic diseases to clarify the prevalence and the clinical presentations of the disorders. In this review, I show an overview of my research works, also including the relation to the latest findings.

Key words : Vitamin D, CaSR, Interleukin-11, FGF23